第24卷 第1期　　昆 虫 学 报　　Vol. 24, No. 1
1981年2月　　ACTA ENTOMOLOGICA SINICA　　Feb., 1981

苏芸金杆菌以色列变种对尖音库蚊的毒杀作用

王 瑛　冯喜昌　温 浩
(中国科学院动物研究所)

摘要　苏芸金杆菌以色列变种 (*Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* de Barjac) 对尖音库蚊 (*Culex pipiens* var. *pallens* Coquillett) 三龄幼虫具有极高的毒性，在浓度为 1.5×10^4 芽孢/毫升时，死亡率达100%。其他几个变种 *B. T.* var. *thuringiensis* (E—009) var. *kurstaki* (HD—1)、var. *kenyae* (7404)、var. *ostriniae* (006) 浓度达 4×10^7 芽孢/毫升时仍未见毒效。

用液体双相与等密度离心法将以色列变种的晶体与芽孢分离，分别研究晶体（纯度达 99.5% 以上）、芽孢（纯度达 99.5% 以上）对尖音库蚊幼虫的毒性。发现使蚊幼虫致死主要是晶体 LC_{50} 为 0.023 微克/毫升，芽孢也具有毒性 LC_{50} 为 0.86 微克/毫升、晶体与芽孢混用制剂的 LC_{50} 为 (0.014 微克晶体＋0.014 微克芽孢)/毫升。

晶体制剂在 30℃ 和 21℃ 的温度条件下毒力没有变化，但芽孢制剂在 21℃ 毒力显著下降；芽孢制剂致死幼虫，立即用相差显微镜镜检，发现肠道内有大量正在萌发的芽孢，对芽孢致死的原因进行了初步分析。

苏芸金杆菌是国内、外农、林上广泛使用的微生物杀虫剂，主要杀灭鳞翅目幼虫，只有极少数品系对蚊幼虫有致病力，但活性较低 (Liles 等，1959；Dulmage，1970)。1977 年 Hall 等测定了苏芸金杆菌 127 个菌株(分属 16 个变种，另有 2 个未鉴定到变种的苏芸金杆菌菌株)对蚊幼虫的毒性。大多数菌株的制剂虽用高浓度 (100 微克/毫升) 对蚊幼虫亦无理想的致病力。只有两个菌株对伊蚊效果较好，LC_{50} 分别为 0.04 微克/毫升与 0.06 微克/毫升。

Goldberg 等人 1977 年从孳生蚊虫水塘的污泥中，分离出一个新的苏芸金杆菌菌株、经 de Barjac 鉴定为一种新的血清型 (H_{14})，定名 *B. T.* var. *israelensis* (de Barjac, 1978 a)。其杀虫谱也具有独特的性质，它对蚊幼虫有极高的毒杀作用，对尖音库蚊 1-2 龄幼虫 ED_{50} 为 6×10^3 芽孢/毫升 (Goldberg, 1978) 而对鳞翅目幼虫毒性反而很低 (de Barjac, 1978b)。因此，对其进行深入研究在阐明苏芸金杆菌的致病机理和应用微生物灭蚊方面均有一定的意义。

材 料 与 方 法

一、细菌与培养方法

B. T. var. *israelensis* (1897) 从捷克引进、*B. T.* var. *thuringiensis* (E—009)、var.

本文于 1979 年 10 月收到。
本研究所用的变种 var. *israelensis* 系由本所沙槎云同志从布拉格带回。实验中所用尖音库蚊卵均由中国医学科学院流行病学研究所提供。工作过程中多蒙沙槎云同志热情的支持与鼓励，作者在此一并致谢.

kurstaki (HD—1)、var. *kenyae* (7404)、var. *ostriniae* (006) 为本所保存菌种。

1. 先将细菌接种到肉汤中 30℃ 培养 24 小时，其间摇荡 2—3 次，然后转接到牛肉膏、蛋白胨琼脂培养基中，在 30℃ 培养 10—15 天即可收获。

2. 将上述培养好的细菌肉汤转接到固体培养基中 [麸 70 克、稻壳 25 克、豆粉 2.5 克(过80 目筛)、鱼粉 2 克(过 80 目筛)、$CaCO_3$ 0.5 克、KH_2PO_4 0.3 克、水适量，调至 pH 8.5。] 30℃培养 4 天，收集培养物。室温干燥或 60℃ 四小时烘干。

二、晶体与芽孢的提纯

用三角玻璃棒从牛肉膏、蛋白胨琼脂培养基上将成熟的菌刮下，用蒸馏水洗三次，生理盐水洗一次。(每次洗后通过离心收集菌)然后加入适量蒸馏水，用电动搅拌机搅拌，打出泡沫，将泡沫收集，用大量蒸馏水漂洗后即得芽孢制剂 (纯度达 99.5% 以上)，冰冻干燥后备用。

用泡沫法去掉部分芽孢后的悬液，再以液体双相法 (四氯化碳与硫酸钠溶液作两相) 进行分离，所得晶体制剂进一步用泛影葡胺等密度离心法分离纯化。纯度可达 99.5% 以上。详细分离方法见另文报道 (王瑛等，1980)。

三、试虫饲养与生物测定

将尖音库蚊卵移入在室温放置三天以上的自来水中，30℃ 饲养(温度实验另设 21℃组)。蚊饲料为：酪蛋白 30%、肝粉 50%、面粉 15%、酵母粉 5%，过 100 目筛。将适量的饲料均匀撒在水面。为了使幼虫生长整齐给以充分照明。

生物测定用 3 龄幼虫，每组 30—40 头，置 200 毫升被试液中。对照组为 60 头 200 毫升室温放置三天以上的自来水，一般观察两天。

结　　果

一、苏芸金杆菌各变种毒力比较

比较了五个苏芸金杆菌变种芽孢晶体混悬液对尖音库蚊幼虫的毒性，除以色列变种有极高的毒性外，其余四个变种对尖音库蚊幼虫没有毒性 (表 1)。

表 1　苏芸金杆菌 5 变种对尖音库蚊三龄幼虫的毒力比较

菌　　株	浓度(芽孢数/毫升)	死亡率 (%)
var. *thuringiensis* (E—009)	4×10^5	3.3
var. *kurstaki* (HD—1)	4×10^5	0
var. *kenyae* (7404)	4×10^5	3.3
var. *ostriniae* (006)	4×10^5	3.3
var. *israelensis* (1897)	1.5×10^4	100
对　照	—	0

二、晶体制剂、芽孢制剂及混合制剂毒力的比较

为了分析以色列变种对尖音库蚊幼虫高毒性的成分，将菌剂的芽孢与晶体分开，分别测定其毒力。实验结果见图 1。可以看出，晶体和芽孢单独都能杀死蚊幼虫，但剂量却有所不同。晶体的 LC_{50} 为 0.023 微克/毫升、芽孢的 LC_{50} 为 0.86 微克/毫升。前者毒性比后

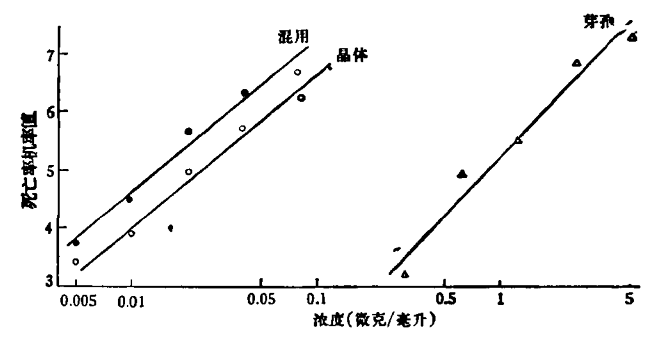


图1 苏芸金杆菌以色列变种晶体、芽孢、与混用制剂*对尖音库蚊三龄幼虫的毒力比较

* 混用制剂的浓度为晶体制剂浓度加等量芽孢制剂浓度，如晶体制剂浓度为0.1微克/毫升

混用制剂浓度即为 $\frac{0.1\text{ 微克晶体}+0.1\text{ 微克芽孢}}{\text{毫升}}$

者约高36倍。混合制剂的 LC_{50} 为 $\frac{0.014\text{ 微克晶体}+0.014\text{ 微克芽孢}}{\text{毫升}}$。

三、致死时间及死虫肠道观察

菌剂处理四小时后，芽孢组（5微克/毫升）、晶体组（0.1微克/毫升）均有幼虫死亡。立即取出死虫肠道在相差显微镜下检查，发现芽孢致死的幼虫肠道内有大量正在萌发的芽孢，而体腔中则没有。晶体组（含有少于0.5%的芽孢）致死幼虫肠道内未见有芽孢。

四、晶体制剂、芽孢制剂及混合制剂的毒力与温度的关系

将蚊幼虫分别置21℃和30℃下进行毒力测定，晶体的毒力不受上述温度变化的影响，芽孢的毒力则受到显著影响。在芽孢浓度为0.5微克/毫升时，30℃的死亡率是21℃死亡率的九倍。21℃时芽孢制剂几乎没有毒力（表2）。

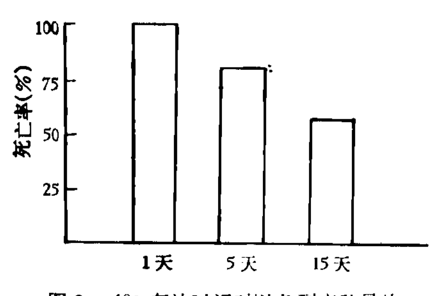


图2 4℃存放时间对以色列变种晶体芽孢悬液毒力的影响

五、以色列变种对蚊幼虫毒力的稳定性

（一）将菌斜面用蒸馏水洗下，制成晶体芽孢悬液（以芽孢计，浓度为 2.5×10^4 芽孢/毫升）在4℃保存，随存放时间的延长，对蚊幼虫的毒力下

表2 温度对以色列变种晶体、芽孢及混合制剂毒力的影响

制剂	浓度(微克/毫升)	死亡率(%) 30℃	死亡率(%) 21℃
晶体	0.5 0.3	100 100	100 100
芽孢	0.5 0.3	45 12	5 0
混合制剂	晶体、芽孢各0.5 晶体、芽孢各0.3	100 100	100 100
对照	—	0	0

降(图 2)。

(二) 当采用麦麸、稻壳等前述固体培养基时后处理必须使其干燥。室温自然干燥的菌剂毒力明显地比 60℃，4 小时烘干的菌剂毒力高。(表 3)说明后者对菌的毒力有破坏作用。

表 3　菌剂高温干燥与室温干燥对毒力的影响

稀释倍数	蚊幼虫死亡率(%)	
	60℃烘干	室温干燥
4×10^3	97.5	100
8×10^3	70	97.5
16×10^3	35	90
32×10^3	12.5	35
64×10^3	10	25
128×10^3	7.5	7.5

讨　　论

自 1977 年 Goldberg 分离出苏芸金杆菌以色列变种 *B. T.* var. *israelensis* 后，发现它对 16 种以上的蚊幼虫(分属于 6 个属)都具有可应用的杀虫活性。而且在高浓度下，只需 30—40 分钟埃及伊蚊 (*Aedes aegypti* Linné) 幼虫死亡率即达 100% (de Barjac, 1978b)。我们用此菌株对尖音库蚊三龄幼虫进行了毒力测定，在浓度为 1.5×10^4 芽孢/毫升时，死亡率达 100%。

苏芸金杆菌具有多种杀虫成份，如：晶体蛋白质毒素、热稳定外毒素、芽孢、酶等。虽然已知其中最主要的是晶体蛋白质毒素，但其他成份在测定昆虫敏感性时所起的作用还不是非常清楚。如 Burges 等 (1976) 证明对于大腊螟 [*Galleria mellonella* (Linnaeus)] 必须芽孢和晶体两者同时存在才能致死，说明芽孢和晶体与毒性都有关系。这一结果与 Heimpel 和 Angus (1959) 提出的第三种类型一致。Smirnoff (1974) 认为含 80% 晶体的制剂并不能杀死云杉卷叶蛾 *Choristoneura fumiferana* (Clemens)，他把这一现象解释为晶体很少或不起作用，主要是芽孢起作用。我们在实验中发现苏芸金杆菌四个变种的纯芽孢对粘虫幼虫都无毒杀效果，而是晶体使粘虫致死(中国科学院，动物研究所苏芸金杆菌研究组，1978)。de Barjac (1978b) 用稀碱液溶解晶体再以乙酸沉淀将以色列变种的晶体蛋白抽提出来进行实验，证明这种高效的毒力与菌株的晶体有关。我们用分离的纯晶体与纯芽孢分别进行毒力测定，证实了晶体是主要的毒性成分，并进一步发现芽孢对尖音库蚊三龄幼虫也有毒性，在芽孢浓度为 2.5—5 微克/毫升时 3 至 4 小时就有大量幼虫死亡。此变种的芽孢对蚊幼虫也具毒性，在文献中尚未见有报道。

根据前人工作，芽孢表现毒性有以下几种可能：1. 芽孢本身含有一种与晶体相类似的毒素，这种毒素用溶解晶体蛋白质的试剂可以溶解，并被特异晶体抗血清灭活 (Somerville 等，1975)。2. 芽孢被鳞翅目幼虫食入后，萌发并侵入寄主血腔，在血腔内大量繁殖引起败血症，导致幼虫死亡 (刘崇乐等，1962)。3. Cheung 等 (1978) 注射苏芸金杆菌芽

孢到棉铃虫 [*Heliothis zea* (Boddie)] 幼虫的血淋巴中,幼虫在 1 小时内呕吐, 6—8 小时内死亡, 注射营养体到此幼虫血淋巴中没有发生这种现象。 由此分析可能是芽孢萌发过程中释放一种对幼虫有害的物质。 我们观察到晶体的毒力不受温度 (30℃ 与 21℃) 的影响,而芽孢的毒力对温度很敏感,很难想象同一种毒素在 30℃ 与 21℃ 之间会有如此明显的差异,因此排除了第一种设想。从致死时间的实验观察到芽孢制剂在浓度为 5 微克/毫升, 30℃ 下 3—4 小时即引起大量幼虫死亡。死后立即镜检,幼虫肠内有大量正在萌发的芽孢,但体腔中没有。根据以上的分析,我们初步认为芽孢使蚊幼虫致死的现象是芽孢在幼虫肠道内萌发时产生某种毒素引起的,即在细菌大量繁殖以前即已致命,这就排除了第二种设想,而是与 Cheung 等 (1978) 的报道较为一致。

关于毒素的稳定性问题, Vaňková 等 (1979) 报道在 80℃ 10 分钟对活性无影响, 但 120℃ 引起活性丧失。 本实验证明 60℃ 4 小时烘干对菌的毒力有破坏作用, 而且既使在 4℃ 保存, 芽孢、晶体悬液的毒力随存放时间延长也明显下降。今后在菌粉生产中这些因素需要考虑。

以色列变种对蚊幼虫毒效高,可进行工业化生产。如能采用一种较好的剂型,使菌剂漂浮在水表层之下,即蚊幼虫棲息的地方,可提高局部毒素的浓度,从而大大节约菌剂,使以色列变种在灭蚊实践上有着更为广阔的前景。

参 考 文 献

王瑛等 1980 苏芸金杆菌 (*Bacillus thuringiensis.*) 晶体与芽孢分离的研究。微生物学报 **20**(3):285—8。

中国科学院动物研究所苏芸金杆菌研究组 1978 苏芸金杆菌不同品系对粘虫、棉铃虫、玉米螟的毒性比较研究初报 微生物学报 **18**(4):352—4

刘崇乐等 1962 苏芸金杆菌研究的五十年, 科学出版社, 第 60 页。

de Barjac, H. 1978a Une nonvelle variete de *Bacillus thuringiensis* tres toxigue pour les Moustigues: *B. t.* var. *israelensis* serotype 14. *C. R. Acad. Sc.* Paris. *Ser. D.* **286**: 797—800.

de Barjac, H. 1978b Toxicite de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* pour les larves *d'Aedes aegypti* et d' *Anopheles stephensi, C. R. Acad. Sc.* Paris, *Ser. D.* **286**: 1175—8.

Burges, H. D. et al. 1976 Importance of spores and δ-endotoxin protein crystals of *Bacillus thuringiensis* in *Galleria mellonella. J. Invert. Path.* **27**: 87.

Cheung, P. Y. K. et al 1978 Hemolymph responses in *Heliothis zea* to inoculation with *Bacillus thuringiensis* or *Micrococcus lysodeikticus. J. Invert. path.* **31**: 148—56.

Dulmage, H. T. 1970 Insecticidal activity of HD-1, a New isolate of *Bacillus thuringiensis* var. *alesti J. Invert. path.* **15**: 232—9.

Goldberg, L. J. and Margalit, J. 1977 A bacterial spore demonstrating rapid larvicidal activity against *Anopheles sergentii, Uranotaenia unguiculata, Culex univitattus, Aedes aegypti* and *Culex pipiens. Mosguito News.* **37**: 355—8.

Goldberg, L. J. 1978 *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (H14) train, ONR 60/WHO/CCBC/1897, 2nd International Workshop on *Bacillus thuringiensis*, Darmstadt, West Germany.

Hall, I. M. et al. 1977 The pathogenicity of strains of *Bacillus thuringinsis* to larvae of *Aedes* and to *Culex* mosquitoes. *Mosquito News.* **37**: 246—51.

Heimpel, A. M. and Angus, T. A. 1959 The site of action of crystalliferous bacteria in *Lepidoptera* larvae. *J. Insect Path.* **1**: 152—70.

Liles, J. N. and Dunn, P. H. 1959 Preliminary laboratory results on the susceptibility of *Aedes aegypti* (Linnaeus) to *Bacillus thuringiensis* Berliner. *J Invert. Path.* **1**: 309—10.

Smirnoff, W. A. 1974 Three years of aerial field experiments with *Bacillus thuringiensis* plus chitinase formulation against the spruce budworm. *J. Invert. Path.* **24**: 344—8.

Somerville, H. J. and Pockett, H. V. 1975 An insect toxin from spores of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus, J. General. Microbiol.* **87**: 359—69.

Voñkova, J. et al. 1979 The pathogenicity of *Baoillus thuringiensis* var. *israelensis* to mosquito larvae. Progress in Invertebrate pathology. p. 219—21.

THE LARVICIDAL ACTIVITY OF *BACILLUS THURINGIENSIS* VAR. *ISRAELENSIS* AGAINST *CULEX PIPIENS* VAR. *PALLENS* COQUILLETT MASQUITO

Wang Ying　Feng Xi-chang　Wen Jie
(Institute of Zoology, Academia Sinica)

This paper we deals with the larvicidal activity of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* against the third instar larvae of *Culex pipiens* var. *pallens* Coquillett. A dosage of 1.5×10^4 spores/ml caused 100% of mortality. Some other varieties of this microbe (*B.t.* var. *thuringiensis* E—009; var. *kurstaki* HD—1; var *kenyae* 7404; var. *ostriniae* 006) showed no effect to the larvae at the concentration of 4×10^5 spores/ml.

By using the fluid diphasic systems and the isopycnic centrifugation, purified crystals and purified spores from var. *israelensis* were obtained. The LC_{50} for purified crystais was 0.23 μg/ml and for Purified spores was 0.86 μg/ml. The LC_{50} for the mixture of both preparations was (0.014 μg crystals + 0.014 μg spores)/ml. These results suggest that crystals play the main role in causing mortality of the mosquite larvae.

The difference of temperature between 30°C and 21°C has no effect on larvicidal activity of the crystal preparation, but has marked effect on the spore preparation. Moreover, there was a lot of germinating spores in the gut of larvae killed by spore preparation as revealed by microscopical examination. No similar phenomenon was observed in the gut of larvae killed by crystal preparation. For this reason it is deduced that the crystal and spore are different in their larvicidal mechanism.